

SUR

LA RÉACTION BIOLOGIQUE DU SANG

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue à l'École Supérieure de Pharmacie de Montpellier

Le Avril 1910

PAR

Raymond DURAND

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université de Montpellier

(MENTION PHARMACIE)

JURY : { MM. H. IMBERT, *Professeur, Président*
L. PLANCHON, *Professeur*
L. GAUCHER, *Agrégé*

MONTPELLIER

SOCIÉTÉ ANONYME DE L'IMPRIMERIE GÉNÉRALE DU MIDI

—
1910

SUR

LA RÉACTION BIOLOGIQUE DU SANG

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue à l'École Supérieure de Pharmacie de Montpellier

Le Avril 1910

PAR

Raymond DURAND

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université de Montpellier

(MENTION PHARMACIE)

JURY : { MM. H. IMBERT, *Professeur, Président*
L. PLANCHON, *Professeur*
L. GAUCHER, *Agrégé*

MONTPELLIER

SOCIÉTÉ ANONYME DE L'IMPRIMERIE GÉNÉRALE DU MIDI

1910



ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

PROFESSEURS

MM. G. MASSOL (I. P. ☞), DIRECTEUR.	<i>Physique.</i>
L. COURCHET (I. P. ☞).....	{ <i>Hist. natur. des médicaments et Botanique.</i>
C. ASTRE (I. P. ☞).....	<i>Chimie générale.</i>
L. PLANCHON (I. P. ☞).....	<i>Matière médicale.</i>
F. JADIN (I. P. ☞).....	<i>Pharmacie.</i>
H. IMBERT (I. P. ☞).	{ <i>Chimie analytique et Toxicologie.</i>
H. FONZES-DIACON (I. P. ☞)..	<i>Chimie minérale.</i>

COURS COMPLÉMENTAIRES ET AUXILIAIRES

MM. GAUCHER (I. P. ☞), ch. de cours.	{ <i>Botanique cryptogamique.</i> <i>Zoologie.</i>
ASTRUC (A. ☞), chargé de cours.	{ <i>Pharmacie galénique.</i> <i>Minéralogie et Hydrologie.</i>
TARBOURIECH (A. ☞). ch. de c.	<i>Chimie biologique.</i>

AGRÉGÉS

MM. GAUCHER (I. P. ☞).
ASTRUC (A. ☞).
TARBOURIECH (A. ☞).

Secrétaire : IZARD (I. P. ☞)

NOTA.—L'École de Pharmacie n'accepte la responsabilité d'aucune des opinions émises par les candidats dans les Thèses ou Synthèses qui lui sont présentées.

A MON PÈRE

A TOUS LES MIENS

R. DURAND.

A MES MAITRES

R. DURAND.

A MES AMIS

R. DURAND.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR HENRI IMBERT

Témoignage de vive reconnaissance.

R. DURAND.

INTRODUCTION

La séro-réaction précipitante du sang, ainsi que l'ont démontré Linossier et Lemoine, n'est que d'une spécificité relative et non absolue. Un sérum précipitant un sang déterminé peut précipiter le sang d'autres animaux, si ce dernier n'est pas en solution suffisamment étendue. On ne peut plus, dès lors, caractériser ce sang que par l'étude de la rapidité de la réaction et de l'abondance du précipité, ce qui laisse toujours un certain doute dans l'esprit de l'expérimentateur. Il est vrai qu'on peut faire disparaître ce doute en opérant sur des liquides sanguins suffisamment étendus.

On verra, au cours de la première partie de ce travail, que les indications données par les divers auteurs sont assez vagues et presque inapplicables, s'il s'agit de caractériser des taches de sang de faibles dimensions, ainsi que cela se produit souvent dans les expertises légales.

Les agents qui interviennent dans la réaction précipitante étant les albuminoïdes ou protéines du sang, sur les indications de M. le professeur Henri Imbert, j'ai essayé de déterminer la quantité minima de ces protéiques nécessaires à la réaction, de façon à savoir quelle est la richesse en albuminoïdes, que doivent contenir les liquides, afin d'obtenir une réaction nettement positive et de manière à ce que, dans les mêmes conditions, les sangs d'espèces d'animaux différents ne donnent absolument aucune réaction.

Nous avons divisé ce travail de la manière suivante :

PREMIÈRE PARTIE :

 Animaux à immuniser;
 Protéiques à injecter;
 Les injections;
 Les antisérums ou immuni-sérums;
 Traitement du sang, dilution des liquides à essayer;
 La séro-réaction;
 Influence de l'état de décomposition du sang;
 Spécificité de la séro-réaction;
 Substances donnant la séro-réaction comme le sang;
 Conservation des antisérums;
 Nature des Protéines réagissant;
 Activité de l'antisérum.

DEUXIÈME PARTIE :

 Recherches des quantités minima d'albuminoïdes du sang nécessaires à la réaction;

 Action des immuni-sérums humains sur les sérums de bœuf, cheval, mouton, poule;

 Action des immuni-sérums sur des dilutions à richesse égale en albuminoïdes des différentes espèces de sang;

 De l'activité des immuni-sérums.

SUR

LA RÉACTION BIOLOGIQUE DU SANG

PREMIÈRE PARTIE

Tchistovitch (1) a trouvé, en se servant des précipitines bactériennes découvertes par Kraus (2), que le sérum des animaux, qui sont traités avec les sérums d'animaux d'autres espèces, produit un précipité dans ces derniers sérums. Bordet (3) confirma ce fait, et même prouva que cette qualité précipitante se montrait aussi après l'injection d'autres albuminoïdes que ceux du sérum, par exemple après l'injection de lait.

Ehrlich (4), Myers (5) et A. Wassermann (6) montrèrent la même réaction précipitante après l'injection d'albumine d'œuf de poule.

Ainsi fut démontré qu'en injectant à un animal une solution d'albuminoïde d'une autre espèce animale, il se formait dans le sang du premier certaines matières albuminoïdes qui avaient la propriété de précipiter cette solution d'albuminoïde.

(1) TCHISTOVITCH. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899.

(2) KRAUS. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 1897.

(3) BORDET. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899.

(4) EHRLICH. *Chroniq. lecture*, 1900.

(5) MYERS. *Centralblatt für Bakteriologie*, 1900.

(6) WASSERMANN. *Verhandlungen des Kongress für innere Medizin*, 1900.

La substance précipitante des albuminoïdes ainsi formée par une voie semblable à celle des agglutinines de Grüber fut d'abord dénommée « agglutinine », puis « coaguline », et enfin, « précipitine ».

Aujourd'hui, on réserve plus spécialement le nom de « précipitines » aux substances qui précipitent les corps albuminoïdes dissous dans le sérum, et celui d'« agglutinines », pour les substances qui agglomèrent les éléments morphologiques.

En résumé, Bordet, Nolf (1), Ehrlich et Morgenroth, Fisch (2), A. Wassermann et Schütze (3) avaient démontré à cette époque la spécificité des précipitines : le sérum d'un animal A soumis aux injections d'albumine d'une espèce animale B précipitait seulement l'albumine de sérum d'animal d'espèce B et non l'albumine des autres espèces d'animaux, s'il ne s'agissait pas d'animaux d'espèces voisines.

« Jusque vers le milieu de 1900, les précipitines manquaient » de tout intérêt pratique, leur étude étant limitée à peu de » laboratoires, et c'étaient exclusivement les savants, qui s'occupaient des problèmes de l'immunité, qui connaissaient le » mieux les précipitines. » (Wassermann, *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 17 mars 1904.)

Ce fut à cette époque que Wassermann indiqua l'importance pratique des précipitines « comme méthode de différenciation de différentes espèces animales ». « A cette occasion, dit-il, je » voudrais signaler une méthode nettement spécifique » qui nous rend possible le diagnostic des différentes espèces » d'albumines, etc...

» Lorsque vous préparez des animaux avec du lait de vache » et que vous les saignez, le sérum obtenu ne précipite que

(1) NOLF. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900.

(2) FISCH. *Courrier of medical Saint-Louis*, 1900.

(3) WASSERMANN ET SCHÜTZE. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 1900.

» les albuminoïdes du lait de vache, mais non pas, par exemple, ceux du lait de femme, de chèvre, etc... » (Wassermann, *loc. cit.*)

Plus tard, Wassermann et Schütze (1) donnèrent à cette méthode le nom de « Méthode de différenciation biologique ».

Ce fut en 1901 que, presque simultanément, parurent les travaux d'Uhlenhuth et de Wassermann et Schütze, sur l'application de la méthode des précipitines pour la recherche médico-légale du sang.

Uhlenhuth (2), de l'Institut de Greisswald, publia sa « Méthode pour la distinction des différentes sortes de sang, en particulier pour le diagnostic du sang humain ».

« Dans mon travail, dit-il, « Nouvelle contribution pour la démonstration spécifique de l'albumine d'œuf par la voie biologique (*Deutsche Med. Woch.*, 1900) », j'ai communiqué une observation que j'ai faite avec le sérum d'un lapin traité par injections intra-péritonéales de sang de poule. Le sérum de cet animal donnait, par addition d'une solution de sang de poule faiblement colorée en rouge, un trouble distinct se produisant très rapidement, puis un précipité floconneux se formait, et aucun trouble ne se produisait avec ce sérum et des solutions de sang de cheval, bœuf, mouton, préparées de la même manière. »

Partant de cette observation, il fit d'autres recherches en vue d'établir s'il n'était pas possible de différencier, à l'aide de cette méthode biologique, le sang de différentes espèces d'animaux, et en particulier le sang humain.

Il fit d'abord une expérience préliminaire à l'aide de sang de bœuf : il injecta tous les six à huit jours 10 cent. cubes de sang défibriné de bœuf dans le péritoine d'un lapin. Après la cinquième injection, il avait un sérum actif.

(1) WASSERMANN ET SCHÜTZE. *Zeitschrift für Hygiene*, 1901.

(2) UHLENHUTH. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* (7 février 1901).

Il fit des dilutions au centième de divers sangs : bœuf, cheval, âne, cochon, mouton, chien, chat, cerf, daim, lièvre, cobaye, rat, souris, lapin, poule, oie, dindon, pigeon et homme. Il prit 2 cc. de chacune de ces dilutions, les mit dans des petits tubes en verre de 6 mm. et les mélangea avec une quantité égale d'eau physiologique contenant 1,6 % de NaCl. Il ajouta dans chacun des tubes VI à VII gouttes de son sérum de lapin préparé avec du sang de bœuf et constata assez rapidement un trouble, particulièrement en regardant le soleil au travers, exclusivement dans le tube contenant du sang de bœuf. Tous les autres tubes restèrent limpides. Le tube contenant le sang de bœuf se troubla de plus en plus, et finalement il se forma un précipité floconneux.

Encouragé par ce succès, il immunisa un lapin par des injections intra-péritonéales de sang humain. Il fit des dilutions de 19 espèces de sang, et, employant le même procédé, obtint un résultat positif, c'est-à-dire un précipité seulement avec une dilution de sang humain.

Il termine sa publication en disant qu'il se forme là probablement des « coagulations spécifiques », définies par Ehrlich et observées par Bordet et Wassermann, par l'injection de différentes caséines, et par lui et Myers par l'injection d'albumine d'œuf.

Le 18 février, Wassermann et Schütze (1), sans avoir eu connaissance des travaux d'Uhlenhuth, publiaient à leur tour leur méthode sur la « différenciation des différentes espèces d'albumines ».

Ils firent à des lapins des injections sous-cutanées de 10 cent. cubes de sérum humain tous les deux jours. Huit jours après la dernière injection, ils sacrifièrent leurs animaux. Ils opérèrent sur 24 espèces de sang, et seul le sang humain

(1) WASSERMANN ET SCHÜTZE. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 1901.

précipita. Ils observèrent en outre que le précipité floconneux était plus abondant en portant les tubes à l'étuve à 37°.

Le sang de singe précipita également, mais après un laps de temps assez long.

Les expériences qu'ils firent sur des taches de sang vieilles de trois mois furent également positives; la tache contenant la dilution de sang humain troubla au bout de vingt minutes et précipita au bout de trente-cinq minutes à l'étuve à 37°.

La technique recommandée par Wassermann et Schütze est la suivante :

Dissoudre la tache de sang présumé dans 6 à 8 cc. de solution physiologique de NaCl; filtrer; répartir également le liquide dans deux tubes stérilisés. Dans le premier, ajouter 0 cc. 5 de sérum de lapin préparé par des injections de sérum humain; dans le deuxième, tube témoin, ajouter 0 cc. 5 de sérum de lapin non préparé. Dans un troisième tube stérilisé, verser 4 à 5 cc. de sang dilué de mouton, de porc ou de toute autre espèce animale, et 0 cc. 5 de sérum du premier lapin.

Mettre les trois tubes à l'étuve à 37°. Si au bout d'une heure le contenu du premier tube se trouble, puis précipite, les deux autres restant limpides, on peut être certain que le sang de la tache à examiner est bien du sang humain. Seul le singe pourrait donner la réaction.

Comme on peut le voir, les méthodes d'Uhlenhuth et de Wassermann et Schütze diffèrent par plusieurs points :

Uhlenhuth emploie le sang défibriné et Wassermann le sérum sanguin;

Uhlenhuth emploie les injections intrapéritonéales. et Wassermann les injections sous-cutanées;

Uhlenhuth injecte tous les six à huit jours 10cc. de liquide, et Wassermann tous les deux jours;

Uhlenhuth emploie le sang de diverses espèces d'animaux à une même dilution (à 1 %), et Wassermann n'indique pas cette dilution.

Le 25 avril de la même année, Uhlenhuth (1) indiqua quelques résultats nouveaux.

Dans un premier ordre d'idées, il montra qu'un sérum de lapin, préparé par exemple avec une solution d'albumine d'œuf de poule, sérum d'ailleurs très actif, précipite non seulement l'albumine d'œuf de poule, mais aussi les dilutions de sang de poule; opérant de même avec l'oie, le canard, etc., il obtint le même résultat. De là, il conclut que des matières albuminoïdes identiques se retrouvent dans le sang comme dans l'œuf, remarque très importante.

Dans un autre ordre d'idées, il montre que du sang vieux de trois mois et même du sang corrompu peuvent se caractériser par cette méthode.

Il prend, le 19 mars, comme échantillon à caractériser :

1° Du sang d'un cadavre décédé le 22 janvier de la même année (phtisie pulmonaire);

2° *Dito* (urémie);

3° Du sang d'un enfant mort-né du 20 janvier;

4° Du sang pris le 1^{er} mars dans la salle d'anatomie et déjà décomposé à cette époque;

5° Du sang d'une personne décédée de tuberculose milliaire, le 20 janvier;

6° Des échantillons de sang d'un homme vivant et sain, du 28 février, du 4 mars, du 10 mars, et exposés à la décomposition.

Tous ces échantillons, d'odeur d'H² S, sentant le pourri, de réaction faiblement alcaline, furent dissous dans l'eau physiologique et les dilutions filtrées à la bougie Berkefeld, pour retenir les bactéries.

4 cc. de chacun de ces liquides furent répartis dans des tubes et additionnés de II gouttes de sérum actif. Seuls les

(1) UHLENHUTH. *Deutsche Med. Woch.*, 25 avril 1901.

tubes contenant du sang humain précipitèrent; tous les autres restèrent limpides.

De là, il conclut que la pulvéfaction ne met pas sa méthode en défaut.

La réaction fut également positive avec des traces de sang gelées dans la neige à une température de 10° centigrades pendant quinze jours.

Il montre également qu'un sérum de lapin préparé avec du sang humain précipite également une urine humaine albumineuse, tandis qu'un sérum de lapin préparé avec de l'albumine d'œuf de poule ne précipite pas.

Son sérum, chauffé à 60°, ne perd pas sa propriété précipitante.

Il préconise d'opérer avec du sérum récemment prélevé; on peut en effet à chaque instant prélever du sang de l'oreille du lapin sans avoir à le tuer et en prélever sans danger pour celui-ci une quantité nécessaire pour l'expérience.

Les travaux précédents ont donc fourni à l'expertise légale le moyen de reconnaître la nature des taches de sang.

De très nombreux travaux ont été publiés depuis la découverte d'Uhlenhuth, de Wassermann et Schütze. Ils ont tous pour but de préciser la réaction. Sans les rapporter désormais par ordre chronologique, nous exposerons successivement les détails qui précisent chaque phase de la méthode.

ANIMAUX A IMMUNISER

Il a été indiqué qu'Uhlenhuth (1) préconisait le lapin à l'exclusion de l'agneau, qu'il considère comme inutilisable. Dans certains cas, Wassermann et Schütze (2) se sont servis de la poule. Hausner (3) préconise le chien, qui peut donner, en

(1) UHLENHUTH. *Deutsche Med. Woch.*, 25 juillet 1901.

(2) WASSERMANN. *Verhandlung des Kongress für Hygiene.*

(3) J. HAUSNER. *Nevrologitschesski Vestnik* (Messager neurologique), 1901.

quatre à cinq saignées partielles, jusqu'à 400 cc. de sang, sans que sa santé paraisse en souffrir.

PROTEIQUES A INJECTER

Tchistovitch (1) a fait ses expériences en injectant du sang; Bordet (2) s'est servi en outre du lait. Ehrlich (3), Myers, Wassermann (4) ont employé l'œuf de poule pour avoir un sérum anti-poule. Wassermann (5) a employé le lait de vache pour un sérum anti-bœuf.

Uhlenhuth (6) s'est servi du sang défibriné; Wassermann et Schütze (7) du sérum sanguin.

C'est avec Mirto Domenico (8) que l'on voit apparaître l'usage du liquide d'ascite, utilisé aussi par Arthus et Vansteenberghe (9). Linossier et Lemoine (10), Butza (11) signalent la possibilité d'employer les liquides d'épanchement pleurétique. F. Majewski (12) se sert de liquide d'hydrocèle et même d'albumine rénale. Il constate que le premier donne un antisérum plus actif que l'injection d'exsudat hydropisique et que l'injection d'albumine rénale fournit un antisérum qui est moins actif que tous les autres.

Schütze (13) injecte les liquides provenant de la macération d'os frais dans une solution physiologique de chlorure de sodium.

(1) TCHIOTOVITCH. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899.

(2) BORDET. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899.

(3) EHRLICH. *Loc. cit.*

(4) WASSERMANN. *Loc. cit.*

(5) WASSERMANN. *Loc. cit.*

(6) UHLENHUTH. *Loc. cit.*

(7) WASSERMANN ET SCHÜTZE. *Loc. cit.*

(8) MIRTO DOMENICO. *Riforma Medica*, 25 sept. 1901.

(9) ARTHUS ET VANSTEENBERGHE. *Comptes rendus de la Société de biologie*, 1^{er} mars 1902.

(10) LINOSSIER ET LEMOINE. *Comptes rendus de la Société de biologie*, 1902.

(11) BUTZA. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 12 avril 1902.

(12) F. MAJEWSKI. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1904.

(13) SCHÜTZE. *Deutsche Med. Woch.*, 1903.

G. Hausner (1) se sert de macération de placenta ou de sérum retiré de la jugulaire des cadavres.

L'idée de Ziemke (2) d'utiliser le sang d'animaux morts depuis plus de dix ans, bien qu'assez curieuse, ne saurait être recommandée à cause des réactions microbiennes qui pourraient se produire en même temps que la réaction provoquée par le sérum actif.

Néanmoins, toutes ces tentatives présentent un grand intérêt à cause de la difficulté que l'on éprouve à se procurer, dans le cas de caractérisation de taches de sang humain pour les expertises criminelles, du sang de l'homme. Les saignées sont en effet de moins en moins fréquentes, de moins en moins abondantes. Il n'y a plus guère que dans les cas d'opérations chirurgicales sanglantes qu'on a quelques chances d'avoir le sang nécessaire pour l'immunisation d'un lapin. Encore le chirurgien porte-t-il le plus souvent toute son attention à éviter une trop grande perte de liquide sanguin. Les essais avec tous les liquides séreux se rapprochant le plus possible du sang offrent donc un grand intérêt. L'injection de lait de femme, de liquide d'ascite surtout, qu'on peut obtenir, lors des ponctions des malades, en très grande quantité, les liquides d'épanchements pleurétiques non tuberculeux, d'hydrocèle, offrent donc pour l'expert légiste la source la plus abondante du liquide albumineux nécessaire à l'immunisation.

LES INJECTIONS

Cette opération doit s'effectuer, bien entendu, avec toutes les précautions d'asepsie utilisées en pareil cas.

Uhlenhuth (3), Linossier et Lemoine (4), Wassermann et

(1) G. HAUSNER. *Münchener Med. Woch.*, 16 février 1904.

(2) E. ZIEMKE. *Deutsche Med. Woch.*, 17 octobre 1901.

(3) UHLENHUTH. *Loc. cit.*

(4) LINOSSIER et LEMOINE. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1902.

Schütze (1) procèdent par injection hypodermique, tandis que Hausner (2) a fait à un chien des injections dans l'épaisseur des muscles vertébraux.

Uhlenhuth, Linossier et Lemoine injectent de 5 à 15 cc. de liquide albumineux tous les six à huit jours, tandis que G. Hausner fait deux injections de 15 à 20 cc. par semaine.

Tous les auteurs sont d'accord pour admettre que cinq à six injections ainsi pratiquées suffisent à donner un antisérum convenable.

L'ANTISERUM OU IMMUNI-SERUM

Wassermann (3) conseille de ne procéder à la saignée de l'animal immunisé qu'une huitaine de jours après la dernière injection. Linossier et Lemoine (4) donnent l'explication de cette pratique : « Nous avons constaté, disent-ils, dans le sang » d'un lapin que nous injectons avec 10 cc. de sérum de » génisse, la présence des albumines de ce sérum pendant » les 7 à 8 jours qui suivaient l'injection, et ce n'est » qu'au moment où l'action du sérum étranger disparaissait » que nous voyons se manifester la propriété précipitante. »

Il est donc nécessaire, d'après cette constatation, de laisser s'écouler de 6 à 8 jours entre la dernière injection et la saignée.

TRAITEMENT DES TACHES SANGLANTES ET DILUTION DES LIQUIDES A ESSAYER

Uhlenhuth (5) dilue d'abord le sang à 1/100^e et mélange ensuite cette solution dans la proportion de 2 cc. de celle-ci pour 2 cc. de solution aqueuse de chlorure de sodium à 16/100^e.

(1) WASSERMANN ET SCHÜTZE. *Loc. cit.*

(2) J. HAUSNER. *Nevrologitchesski Vestnik*, 1901.

(3) WASSERMANN. *Loc. cit.*

(4) LINOSSIER et LEMOINE. *Loc. cit.*

(5) UHLENHUTH. *Loc. cit.*

Hausner (1) a pu obtenir une réaction encore nette avec 1 goutte de sang diluée dans 300 fois son volume d'eau.

Ziegler (2) dilue le sang à examiner dans la proportion de 1 %.

Linossier et Lemoine (3), après avoir démontré que la séro-réaction n'est pas d'une spécificité absolue mais seulement relative, question qui sera développée ultérieurement, diluent la tache dans 2.500 fois son volume de solution de chlorure de sodium à 7/1000°. Ils ont obtenu une réaction encore nette en diluant du sérum à 1/1000° et contenant par suite environ 1/15.000° d'albumine.

Ils constatent que le chlorure de sodium gêne bien un peu la réaction, mais ils expriment d'autre part la crainte que la dilution de sérum ou des taches dans l'eau distillée simple n'amène la précipitation de la globuline du sang, d'après l'observation de Nolf (4), globuline qui est précipitée par les anti-sérums préparés avec le sérum complet.

Seul, Uhlenhuth (5) stérilise les liquides ainsi obtenus par filtration à la bougie Berkfeld, sous pression réduite.

SERO-REACTION

C'est en général sur 2 à 4 cc. des dilutions de sérum ou des taches à caractériser, placés dans de petits tubes à essai de 4 à 6 millimètres de diamètre et stérilisés au four à flamber, que la plupart des auteurs opèrent. Ils y ajoutent alors quelques gouttes — X à XV — d'antisérum, et ils exposent à la température de 37°, suivant l'observation de Wassermann (6).

(1) HAUSNER. *Loc. cit.*

(2) K. ZIEGLER. *Centralblatt für Allgemeine Pathologie und pathologischen Anatomie*, 28 avril 1902.

(3) LINOSSIER et LEMOINE. *Loc. cit.*

(4) NOLF. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900.

(5) UHLENHUTH. *Loc. cit.*

(6) WASSERMANN. *Loc. cit.*

Wassermann et Schütze (1) ont alors pu constater un trouble en vingt minutes et un précipité en trente-cinq minutes avec des taches de sang datant de trois mois. Ils admettent que la réaction n'est positive que si le trouble apparaît avant une heure. C'est aussi l'avis qu'à émis Ziegler (2).

Linossier et Lemoine admettent que la réaction doit se produire en une ou deux heures au maximum. Au bout d'un temps plus long, l'apparition du trouble et du précipité peut tenir à la transformation des protéines sous des influences microbiennes.

INFLUENCE DE L'ETAT DE DECOMPOSITION DU SANG

Wassermann et Schütze (3) ont essayé la séro-réaction avec des taches de sang de la dimension d'une pièce de 1 franc faites sur des tissus de laine, sur des couteaux abandonnés dans le laboratoire pendant trois mois à toutes les poussières. Ils ont ainsi toujours obtenu une réaction positive.

Uhlenhuth (4) a opéré ainsi qu'il a été dit antérieurement sur des échantillons de sang putréfié, possédant nettement l'odeur de l'hydrogène sulfuré, de réaction faiblement alcaline, sans éprouver aucune difficulté. Il semble donc que la putréfaction ou les agents atmosphériques ne puissent gêner la séro-réaction; il reste toujours assez d'albumine non altérée pour que la réaction se produise.

Uhlenhuth (5) a même pu obtenir la séro-réaction avec du sang de momie vieille d'environ soixante ans. Cependant, avec le sang des momies très anciennes les résultats ont été négatifs.

(1) UHLENHUTH. *Loc. cit.*

(2) WASSERMANN et SCHÜTZE. *Loc. cit.*

(3) ZIEGLER. *Loc. cit.*

(4) WASSERMANN et SCHÜTZE. *Loc. cit.*

(5) UHLENHUTH. *Deutsche Medic. Woch.*, 9 février 1905.

SPECIFICITE DE LA SERO-REACTION

Jusqu'aux travaux de Linossier et Lemoine, la séro-réaction avait été considérée comme d'une spécificité absolue. On admettait, en effet, qu'un sérum anti-bœuf par exemple ne précipitait que le sérum de bœuf.

Wassermann et Schütze (1) n'avaient fait qu'une seule exception : un sérum actif pour le sang humain s'était montré actif encore, mais à un moindre degré, pour le sang de singe.

Il résulte en réalité des travaux de Linossier et Lemoine que la spécificité des antisérums est seulement relative et non absolue.

« La première question qui se pose, disent ces auteurs, » concerne la spécificité de la réaction précipitante; si cette » spécificité, confirmée par toutes les recherches antérieures » aux nôtres, venait à être mise en doute, la confiance en la » méthode que nous venons de décrire serait par là même » très ébranlée.

» Or, il résulte de nos recherches que, en dépit des affir- » mations concordantes des expérimentateurs qui nous ont » précédés, les sérums précipitants ne sont pas spécifiques. » En réalité, une même précipitine peut agir sur un très grand » nombre de sérums différents; la sensibilité seule de la réac- » tions varie, les précipités obtenus étant en général d'autant » moins volumineux que l'animal dont on étudie le sérum est » plus éloigné dans l'échelle des êtres vivants de celui dont le » sang a servi aux injections provocatrices du développement » de la précipitine. Le fait est trop important pour que nous » nous contentions d'apporter sur ce point une simple affir- » mation. »

(1) WASSERMANN et SCHÜTZE. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 1901

En mélangeant, en effet, un sérum précipitant avec des sérums très variés, dans les proportions de 10 volumes de l'antisérum pour un volume des autres, un précipité se produit avec toutes sortes de sérums.

« Il n'en existe pas moins, ajoutent-ils une spécificité relative qui se traduit de deux manières :

» 1° En ce que les quantités de précipitrine nécessaires pour provoquer un trouble dans un sérum donné sont beaucoup moindres quand ce sérum est le sérum correspondant;

» 2° En ce que le précipité, provoqué par une précipitrine dans le sérum correspondant, est incomparablement plus volumineux que dans un autre sérum. Aussi peut-on déceler le premier dans une solution assez diluée pour qu'un autre sérum, à la même dilution, ne soit pas troublé. »

Ils conseillent, par suite, de dissoudre la tache de sang dans 2.500 parties d'eau.

Ces auteurs ajoutent, au sujet de la spécificité du sérum, une remarque qui, dans certaines expertises, peut avoir une importance considérable :

« Nous ferons remarquer que le sérum de lapin n'est *absolument pas précipité* par le sérum *actif* développé dans l'organisme du lapin. Bien que nous n'ayons pas réalisé l'expérience, il nous semble probable que, de même, un sérum actif développé dans l'organisme d'un chien ne précipiterait pas le sérum de chien. On pourrait ainsi préparer une série de sérums précipitants sans aucune action sur un sérum particulier. »

Dans la pratique de l'expertise légale de taches de sang, le nombre de sérums précipitants à préparer serait en réalité assez restreint. L'inculpé, dont les vêtements ou les armes sont tachés, mis en demeure d'expliquer l'origine de ces taches, indiquera un animal, en général domestique (poule, lapin, mouton, etc.), ou un gibier assez commun (lièvre, etc.),

dont il sera possible de se procurer un individu vivant, qui pourra être immunisé, et dont le sérum ne doit pas précipiter les taches suspectes si le dire de l'accusé est conforme à la vérité. Ce serait là un moyen d'une spécificité absolue qui ne compliquerait pas, outre mesure, les opérations.

On peut rapprocher du travail de Linossier et Lemoine celui d'Uhlenhuth (1) d'après lequel un antisérum pour cheval précipite le sang d'âne, un antisérum de mouton précipite les sangs de chèvre et de bœuf, et un antisérum de lièvre précipite le sang de lapin.

Si l'on immunise un poulet avec du sang de lièvre, on obtient un sérum de poulet anti-lièvre, qui précipite à la fois les sérums de lapin et de lièvre. Mais un antisérum lapin-anti-lièvre, c'est-à-dire obtenu en injectant du sang de lièvre à un lapin précipitera le serum de lièvre à l'exclusion du sérum de lapin. On pourra ainsi différencier le sang de lapin du sang de lièvre.

SUBSTANCE DONNANT LA SERO-REACTION COMME LE SANG

Il importe, au point de vue légal, de savoir si le sang seul peut donner la séro-réaction avec un antisérum. *A priori*, il est évident que tout liquide ou toute substance qui, pour une cause quelconque, contient les mêmes protéines que le sang, donnera une réaction positive.

C'est ainsi que les liquides d'ascite, de pleurésie, l'urine albumineuse, le lait de femme, le mucus nasal (Hausner (2)), le liquide d'hydrocèle, le sperme (Uhlenhuth (3)), Wasser-

(1) UHLENHUTH. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 19 octobre 1905.

(2) HAUSNER. *Nevrolog. Vestnik*, 1901.

(3) UHLENHUTH. *Deutsche Med. Woch.*, 25 juillet 1901.

mann (1), une macération d'os dans un état de décomposition peu avancée [Tovo] (2), peuvent donner des réactions positives.

Voici les conclusions d'un travail fait à ce sujet par M. le docteur Fleig (3) dans le laboratoire de physiologie de la Faculté de médecine et le laboratoire de toxicologie de l'Ecole supérieure de Pharmacie de Montpellier :

« Le sérum de lapin, par injection de liquide de pleurésie
» humaine, précipite non seulement le sérum sanguin humain,
» les liquides d'ascite, de pleurésie, de péritonite, le lait, l'urine albumineuse, le sperme, les macérations de muscles,
» la salive, mais encore le liquide céphalo-rachidien, les
» liquides de kystes ovariens, le colostrum, le pus, etc... la
» précipitation du lait, du sperme, des extraits de muscles,
» de la salive entr'autres, est beaucoup moins intense que
» celle des liquides tels que le sérum sanguin, le liquide d'ascite, le colostrum le pus, etc. Ces différences tiennent à la
» richesse plus ou moins grande de ces liquides en globuline.

» La salive parotidienne précipite plus facilement que la
» salive mixte, la forte proportion de mucine contenue dans
» cette dernière ayant une action inhibitrice, action manifeste
» d'ailleurs vis-à-vis des transformations diastasiques.

» Les matières fécales normales, le méconium ne donnent
» pas la réaction précipitante.

» Les selles diarrhéiques contenant des matières albuminoïdes appropriées peuvent provoquer une réaction positive.

» Les viandes soumises à la digestion gastrique *in vitro*
» ou *in vivo* peuvent encore être précipitables par un sérum
» actif si la digestion n'a pas été complète. »

(1) WASSERMANN. *Deutsche med. Woch.* 17 mars 1904.

(2) TOVO. *Archives de Psych. Méd et Anat. crim.*, 1905.

(3) FLEIG *Annales d'hygiène publique et de Médecine légale*, août 1908.

Il importe de ne pas perdre ces faits de vue, en raison d'une erreur déjà signalée par Wassermann (1) :

Une femme présentait sur sa jupe des taches brunes. A l'examen, on conclut à la présence du sang. Ces taches provenaient de quelques gouttes de lait écoulées des glandes mammaires.

Il n'est pas douteux qu'en pareil cas, on doit s'assurer d'abord, par des réactions bien connues, si réellement les taches contiennent du sang et si, d'autre part, elle ne contiennent pas les éléments des liquides séreux analogues au sang.

« Les albumines des sérosités humaines, dit Uhlenhuth (2), » donnent la même réaction que le sang. Dans ce cas, la » chimie et l'examen microscopique doivent venir en aide au » séro-diagnostic.

Il ne saurait venir à l'idée d'un expert consciencieux, de baser une inculpation sur la seule séro-réaction, à l'exclusion des réactions chimiques du sang et de l'examen microscopique des taches.

CONSERVATION DES ANTISÉRUMS

C'est là un point très important pour l'expert qui peut être appelé à donner son avis en un temps très court. Or, l'immunisation d'un animal demande au minimum 18 jours; encore vaut-il mieux, d'après le travail de Linossier et Lemoine (3), n'effectuer les injections que tous les cinq à huit jours.

Sans doute, ainsi que l'on préconisé divers auteurs, et en particulier Uhlenhuth (4), on peut effectuer la saignée partielle de l'animal et retirer, par exemple du lapin, par une saignée

(1) WASSERMANN. *Deutsche Med. Woch.*, 17 mars 1904.

(2) UHLENHUTH. *Deutsche Med. Woch.*, 25 avril 1901.

(3) LINOSSIER et LEMOINE. *Loc. cit.*

(4) UHLENHUTH. *Deutsche med. Woch.*, 11-18 sept. 1902.

à la veine marginale de l'oreille, quelques centimètres cubes de sang seulement, nécessaires à la séro-réaction. Mais, dans ce cas, il faut avoir un animal constamment immunisé. Ce qui n'est pas sans inconvénient.

Le sérum se conserve aussi en bon état, mais pendant un temps relativement court, à la glacière [Uhlenhuth] (1).

Hausner (2) a conseillé de dessécher l'antisérum disposé en minces couches, dans des boîtes de Pétri, à froid, à l'abri de la lumière et dans le vide. Mais l'auteur n'indique pas pendant combien de temps cet extrait de sérum garde son activité.

Erssin Jacobstal (3) préconise un moyen analogue qui consiste à imprégner d'un nombre déterminé de gouttes de sang, un papier à filtrer Schleicher et Schüll n° 571, qui, après dessiccation, peut être introduit dans l'eau en proportion déterminée correspondant à un nombre connu de gouttes de sérum. Ce papier garderait son activité plusieurs mois.

Arthus et Vansteenberghe (4) ajoutent du fluorure de sodium au sérum, en vue de sa conservation.

Fleig (5) indique que l'addition de formol aux tubes dans lesquels il a fait la réaction, n'a pas paru gêner celle-ci. Dans des tubes contenant 0 cc. 1 de formol à 1 %, la précipitation s'est faite exactement dans le même temps, et a été aussi intense que dans les tubes ne contenant pas d'aldéhyde formique; dans les tubes additionnés de 0 cc. 5 de formaline, elle a seulement été un peu plus tardive, mais le résultat final a été tout aussi net. L'addition de formol à l'antisérum pourrait donc en faciliter la conservation.

(1) UHLENHUTH. *Deutsche med. Woch.*, 25 juillet 1901.

(2) HAUSNER. *Nevrol. Vestnik*, 1901.

(3) ERSSIN JACOBSTAL. *Arch. für Hyg.*, 1904.

(4) ARTHUS et VANSTEENBERGHE. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1^{er} mars 1902.

(5) FLEIG. *Loc. cit.*

Mais, étant donné l'action que cette substance exerce, à la longue, sur les protéines, il n'est guère permis d'espérer de conserver ainsi le réactif.

Il convient de signaler encore une tentative de Mirto Domenico (1) qui, après avoir isolé par la méthode de Hammarsten la paraglobuline d'un sérum actif pour le sang humain, a reconnu la spécificité de cette substance pour la paraglobuline humaine et la conservation de son activité pendant un mois.

En résumé, pour le moment, le mieux est d'immuniser un animal au moment du besoin, dût-on précipiter les injections.

NATURE DES PROTÉINES RÉAGISSANT

Mirto Domenico (2) a isolé par le procédé Hammarsten, la paraglobuline du liquide d'ascite, et s'en est servi pour provoquer la formation de précipitine chez le lapin, en injectant cette substance en solution à 2 %. Il a ainsi obtenu un antisérum actif pour le sang humain. La paraglobuline extraite de cet antisérum, isolée et en solution à 2 %, précipite encore du sérum humain.

Falloise (3) a injecté de la globuline de cheval qui a donné un antisérum actif vis-à-vis du sérum de cheval et de la globuline de cet animal, mais qui précipite à peine les solutions de sérine de cheval.

Inversement, un lapin immunisé avec une solution de sérine de ce cheval a fourni un antisérum actif vis-à-vis du sérum de cheval et d'une solution de sérine, mais qui trouble encore une solution de globuline de cheval. Cela tient, d'après l'auteur, à ce qu'il est à peu près impossible d'obtenir les globulines absolument exemptes de sérine.

(1) MIRTO DOMENICO. *Riforma Medica*, 25 sept. 1901.

(2) MIRTO DOMENICO. *Rif. Med.*, 25 sept. 1901.

(3) FALLOISE. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902.

La sérine, d'après Nolf, ne donnerait pas de précipiline antisérine.

Mais, d'après Linossier et Lemoine, bien que la sérine joue, dans la réaction, un rôle secondaire, il est possible que cette substance ne soit pas absolument inactive.

Un sérum préparé avec des injections de globuline ne précipite pas la caséine du lait, mais seulement les globulines, tandis qu'un sérum préparé avec des injections de lait précipitera la caséine du lait et non les globulines. C'est ce qui explique notamment qu'un antisérum préparé avec du sang précipitera mieux le colostrum ou le lait colostré, que le lait exempt de colostrum, c'est-à-dire le lait recueilli plusieurs jours après la parturition. Le colostrum est, en effet, plus riche en globuline que le lait normal. Ce même sérum sera aussi actif vis-à-vis du pus [Fleig] (1) d'abcès chaud ou de processus infectieux, que vis-à-vis du sérum sanguin.

Donc, sans nier l'action que peuvent avoir les sérines dans la séro-réaction, il paraît manifeste que celle-ci est surtout due aux globulines.

ACTIVITÉ DE L'ANTISÉRUM

L'activité de l'antisérum, même lorsqu'on suit minutieusement les indications des différents auteurs, n'est pas toujours la même.

On peut s'en assurer en déterminant le temps nécessaire à la formation du louche et du précipité dans la séro-réaction, au moyen de deux antisérums actifs que l'on fait réagir, sur une même dilution sanguine et dans les mêmes proportions. Trop de facteurs échappent encore à l'observation, pour que l'on puisse être certain d'arriver à des sérums de même activité.

(1) FLEIG. *Loc. cit.*

Wassermann et Schütze (1) ont proposé de mesurer l'activité des antisérums en prenant, comme unité de mesure, l'antisérum qui précipite en 1 heure à 37° le sang desséché, le sérum actif étant ajouté dans les proportions de 1 cc. d'antisérum pour 0 cc. 1 de sang dissous dans la solution physiologique de chlorure de sodium à 8,5 pour mille.

Un sérum qui sous un volume de 0 cc. 1, précipiterait en un heure 0 cc. 1 de sang desséché et redissous, contiendrait 10 unités précipitantes, ce qui revient à dire qu'il serait 10 fois plus actif.

L'étude de la séro-réaction a été l'objet d'un développement considérable qui sortirait du cadre de ce travail.

Je me contenterai de signaler simplement la possibilité d'appliquer cette méthode de recherches à quelques problèmes qui peuvent être soumis encore aux pharmaciens experts :

1° Le mélange de laits d'animaux différents;

2° Le mélange de viandes d'animaux différents (viande de cheval en charcuterie).

3° La recherche dans certaines matières (margarine ou pâtes alimentaires), de jaune d'œufs.

(1) WASSERMANN et SCHÜTZE. *Loc. cit.*

DEUXIÈME PARTIE

Il résulte de ce qui précède, que des quantités très faibles, un milligramme d'albumine du sang, suffisent à la caractérisation des taches de sang par la séro-réaction.

Linossier et Lemoine, en indiquant que la séro-réaction n'a qu'une spécificité relative et non une spécificité absolue, recommandent de diluer le sérum sanguin au millième, c'est-à-dire, pour réaliser une telle solution, de dissoudre la tache dans 2500 parties de solution physiologique de chlorure de sodium. Ils ajoutent que si les auteurs, qui se sont occupés antérieurement de la question, ont considéré la réaction comme ayant une spécificité absolue, c'est qu'ils se sont mis, sans s'en douter, dans des conditions de dilution convenable.

Le plus souvent, l'expert n'a, à sa disposition, que des taches de dimensions variables allant de plusieurs centimètres à un ou deux millimètres de diamètre, représentant un volume de sérum inconnu. Dans ces conditions, il lui est difficile de faire les dilutions indiquées par Linossier et Lemoine, et, d'autre part, il est tenté de faire des solutions aussi concentrées que possible, pour obtenir une précipitation nette, afin de faire disparaître tous les doutes de son esprit.

Sur les indications de M. le professeur Imbert, je me suis proposé d'étudier la séro-réaction en considérant les richesses en albuminoïdes des solutions sanguines sur lesquelles j'agissais. Le dosage des albuminoïdes par la méthode de Denigès est d'une si grande simplicité et applicable à des so-

lutions de concentration si variables, qu'il nous a semblé que l'on peut doser ces corps dans la plupart des conditions d'expertise.

Nous avons donc pensé que nous pourrions établir ainsi, d'une part, la limite de dilution à laquelle un sérum donné peut permettre d'établir des conclusions certaines; d'autre part, les richesses des dilutions d'albuminoïdes des divers sangs, telles que l'on n'ait pas à craindre d'interprétation erronée.

J'ai, pour cela, immunisé deux lapins, l'un par injections intrapéritonéales, l'autre par injections hypodermiques, avec du liquide d'ascite recueilli aseptiquement. Les injections ont été faites avec toutes les précautions d'asepsie habituelle. Et afin de voir si les animaux supportaient convenablement ces opérations, nous les avons pesés avant chaque injection.

Les animaux immunisés ont été ensuite saignés par l'une des carotides, au moyen de sondes bien aseptiques, et le sang a été recueilli dans des flacons parfaitement stérilisés au four à flamber. Après coagulation de la fibrine, le sérum a été centrifugé dans des tubes également stérilisés, puis flaconné dans des flacons eux-mêmes stérilisés.

J'ai alors essayé ces sérums, d'une part, sur les dilutions de sang humain frais, d'autre part, sur des dilutions de sang humain provenant de taches faites sur un mouchoir, et datant du mois de mars 1908, enfin, sur des dilutions de sérum de divers animaux, bœuf, cheval, mouton, poule, dans des conditions variables de concentrations.

Pour cela, 2 cc. des solutions précédentes étaient mélangés dans des tubes stérilisés avec X à XXX gouttes des divers immuni-sérums obtenus, et exposés à la température de 37°.

Je n'ai pas stérilisé les dilutions sanguines, parce qu'il arrive fréquemment, en expertise, que cette opération est à peu près impossible. J'ai vu le cas où les taches de sang à carac-

tériser, relativement peu nombreuses, n'offraient, les unes et les autres, qu'un diamètre de un à deux millimètres. On ne peut songer, dans ces conditions, à la filtration à la bougie, qui ferait perdre à peu près tout le liquide, ni à la pasteurisation qui pourrait coaguler les albuminoïdes.

J'ai ainsi recherché :

1° La quantité minima d'albuminoïdes nécessaire à la réaction;

2° L'action des immuni-sérums humains sur les sérums de bœuf, cheval, mouton, poule, à des dilutions variables;

3° L'action des immuni-sérums sur des dilutions à richesse égale d'albuminoïdes du sérum humain et des sérums de bœuf, cheval, mouton et poule;

4° J'ai cru devoir joindre aux résultats des recherches précédentes, les tentatives peu heureuses que j'ai faites avec des immuni-sérums d'activité relativement faible.

Les premiers résultats ont été obtenus au moyen de sérums rendus actifs par injections intrapéritonéales et hypodermiques faites à deux lapins dans les conditions résumées dans le tableau ci-après.

TABEAU I

LAPIN N° 1			LAPIN N° 2		
DATES des INJECTIONS	POIDS DE L'ANIMAL AVANT L'INJECTION	NOMBRE de CENT. CUBES INJECTÉS	DATES des INJECTIONS	POIDS DE L'ANIMAL AVANT L'INJECTION	NOMBRE de CENT. CUBES INJECTÉS
7 juin 1909	2590 gr.	15	7 juin 1909	2035 gr.	9
12 —	2323 —	15	12 —	1917 —	15
18 —	2435 —	15	18 —	2078 —	15
23 —	2336 —	15	23 —	2100 —	16
29 —	2315 —	17	29 —	2029 —	15
7 juill. 1909	2433 —	11	7 Juill. 1909 ₄	2226 —	9
		88			79

Les animaux ont été sacrifiés le 7 juillet, c'est-à-dire six jours après la dernière injection.

Taches et sérums étaient dilués avec une solution à 7 gr. pour mille de chlorure de sodium, c'est-à-dire une solution sensiblement isotonique avec le sang.

RECHERCHE DE LA QUANTITÉ MINIMA D'ALBUMINOÏDES DU SANG NÉCESSAIRE A LA RÉACTION

Dans cette première série d'expériences, j'ai cherché quelle était la quantité minima d'albumine du sang humain qui pouvait être décelée par les sérums précédents.

Il a été préparé, d'une part, une solution de sang frais provenant de pansements qui nous ont été obligeamment fournis par M. Ch. Jourdan, interne des hôpitaux de Montpellier. Les taches ont été traitées par la solution de chlorure de sodium. La richesse du liquide ainsi obtenu était de 7 gr. 3575 par litre, en albuminoïdes.

La séro-réaction a été opérée sur des dilutions au :

$$\frac{1}{2}; \quad \frac{1}{25}; \quad \frac{1}{50}; \quad \frac{1}{75}; \quad \frac{1}{100};$$

D'autre part, la même opération a été faite sur une dilution de sang humain obtenue en lavant des taches de sang humain faites sur un mouchoir et datant du mois de mars 1908. Dans les tableaux ci-après, on trouvera les résultats qui nous ont été fournis par le sérum préparé par injection intra-péritonéale et ceux qui ont été obtenus par injection hypodermique.

TABLEAU II

Solution de Sang frais : 2 cent. cubes
Immuni-Sérum obtenu par injections intra-péritonéales : XV gouttes

DURÉE de la RÉACTION	SOLUTION SANGUINE à 7 gr. 3575 d'albumine par litre Opération sur 14 mg. 7 d'alb.	SOLUTION PRÉCÉDENTE diluée à 1/2 Opération sur 7 mg. 355 d'alb.	Première solution diluée à 1/25 opération sur 0 mg. 55 d'alb.	PREMIÈRE SOLUTION diluée à 1/50 Opération sur 0 mg. 29 d'alb.
Au bout de 10 m.	Trouble	Trouble	»	»
20 m.	id.	id.	Trouble	»
1 h.	Précipité abondant	Précipité abondant	id.	Quelques flocons
1 h. 45 m.	Précipité très abondant	id.	id.	id.
3 h. 45 m.	id.	id.	Précipité et flocons en suspension	Léger précipité et flocons en suspension
6 h. 30 m.	Gros précipité	Gros précipité	Précipité abondant	Précipité
7 h. 30 m.	id.	id.	id.	id.
22 h.	id.	id.	id.	id.
Les dilutions à..... 1/75, 1/100, 1/1000 n'ont rien donné en 6 heures.				

La réaction a donc été nettement positive avec 14 milligr. 7 et 7 milligr. 3 d'albumine au bout d'une heure; avec 0 milligr. 5, la réaction a été encore nette en 1 h. 45 minutes.

Mais, avec la solution à 0 milligr. 29, on ne peut plus compter sur des résultats certains. Il est inutile d'ajouter que les dilutions à 1/50^e, 1/75^e, 1/100^e n'ont donné de trouble qu'au bout d'un temps très long, six heures, et qu'on ne saurait baser une inculpation sur ces résultats.

TABLEAU III

Solution de Taches de Sang vieilles de 14 mois : 2 cent. cubes
Immuni-Sérum obtenu par injections intrapéritonéales : XV gouttes

DURÉE de la RÉACTION	SOLUTION SANGUINE à 1 gr. 4515 d'alb, par litre Opération sur : 2 milligr. 9 d'alb.	SOLUTION PRÉCÉDENTE diluée à 1/2 Opération sur : 1 mil. 46 d'alb.	PREMIÈRE SOLUTION diluée à 1/25 Opération sur : 0 mil. 116 d'alb.
Au bout de 10 min.	Trouble	Trouble	»
20 —	id.	id.	»
1 h.	Flocons nets	Quelques flocons	»
1 h. 45 —	Précipité très net	Flocons	»
3 h. 45 —	Précipité floconneux abondant	Précipité floconneux assez abond.	»
6 h. 30 —	Précipité abondant réuni	Précipité abondant réuni	Très légers flocons
7 h. 30 —	id.	id.	id.
22 h.	id.	id.	Précipité et flocons
Les dilutions à : 1 /50, 1 /75, 1 /100 n'ont donné un trouble qu'au bout d'un très grand nombre d'heures.			

Ce sang vieux de 14 mois a fourni encore des résultats très nets avec 2 milligr. 9 et 1 milligr. 46 d'albumine.

TABLEAU IV
Solution de Sang frais : 2 cent. cubes
Immuni-Sérum obtenu par injections hypodermiques : XV gouttes

DURÉE de la RÉACTION	SOLUTION SANGUINE à 7 gr. 3575 d'albumine Opération sur 14 mil. 71 d'alb.	SOLUTION PRÉCÉDENTE diluée à $\frac{1}{2}$ Opération sur : 7 mil. 335 d'alb.	PREMIÈRE SOLUTION diluée à $\frac{1}{25}$ Opération sur : 0 mil. 58 d'alb.
Au bout de 10 min.	Trouble	Trouble	»
20 —	id.	id.	»
1 h.	Précipité abondant	Précipité abondant	Léger louche
1 h. 45 —	Précipité très abondant	id.	Trouble
3 h. 45 —	Précipité très abondant et bien aggloméré	id.	Légers flocons
6 h. 30 —	Gros précipité	id.	Précipité peu abondant
7 h. 30 —	id.	id.	Léger précipité
22 h.	id.	id.	id.

Les dilutions à : 1/50, 1/75, 1/100, 1/1000 n'ont un trouble qu'au bout de plusieurs heures.

Avec 14 milligr. 71 et 7 milligr. 335, les réactions sont encore ici très nettes; la quantité de 0 milligr. 58 donne encore une réaction convenable.

TABEAU V
Solution de Taches de Sang vieilles de 14 mois : 2 cent. cubes
Immun-Sérum obtenu par injections hypodermiques : XV gouttes

DURÉE de la RÉACTION	SOLUTION SANGUINE à 1 gr. 4715 d'alb. par litre Opération sur : 2 milligr. 9 d'alb.	SOLUTION PRÉCÉDENTE diluée à $\frac{1}{2}$ Opération sur : 1 mill. 46 d'alb.	PREMIÈRE SOLUTION diluée à 1/25 Opération sur : 0 mil. 116 d'alb.
Au] bout de 10 min.	Trouble net	Trouble net	»
20 —	id.	id.	»
1 h.	Flocons apparents	id.	»
1 h. 45 —	Flocons nets	Flocons	»
3 h. 45 —	Précipité floconneux abondant	Précipité floconneux assez abon.	»
6 h. 30 —	Précipité abondant	Précipité abondant	Douteux
7 h. 30 —	id.	id.	id.
22 h.	id.	id.	Précipité

Les dilutions à : 1/50, 1/75, 1/100, 1/1000 n'ont rien donné du tout.

Ici encore, 1 milligr. 46 d'albumine a donné des résultats très nets.

Il résulte, de toutes ces recherches, que la séro-réaction fournit des résultats suffisamment positifs avec une quantité d'albumine égale à un demi-milligramme.

Les deux sérums dont je me suis servi, obtenus l'un par injection intra-péritonéale, l'autre par injection hypodermique, étaient d'une activité à peu près identique.

Durant le temps pendant lequel se faisaient ces expériences, j'ai essayé, comme témoin, d'abandonner à 37°, les solutions sanguines précédentes sans addition de sérum et un mélange de sérum inactif de lapin et de sérum actif.

Les solutions sanguines non diluées de sang récent ou de sang ancien, ont donné un très léger louche en 3 h. 30, se réduisant à une simple opalescence sans précipité, après 6 h. 30.

Les dilutions au demi de ces solutions n'ont absolument rien donné, même après 96 heures.

Quant au sérum inactif, il n'a rigoureusement rien donné en 96 heures. C'est là un contrôle de ce qu'ont admis Linossier et Lemoine.

ACTION DES IMMUNI-SÉRUMS HUMAINS SUR LES SÉRUMS DE BOEUF, CHEVAL, MOUTON, POULE

Pour contrôler les expériences de Linossier et Lemoine, sur la spécificité relative des sérums, et arriver, si possible, à une dilution d'albumine telle que la séro-réaction ne puisse se produire avec aucun autre sérum que le sérum humain, j'ai cru devoir faire des expériences sur les sérums de bœuf, cheval, mouton, poule.

Les albumines ont été dosées dans tous ces sérums par le procédé Denigès. Il a été ainsi trouvé :

Sérum de bœuf.....	56 gr. 317	d'albumine par litre	
Sérum de cheval.....	41 gr. 937	—	—
Sérum de mouton.....	45 gr. 616	—	—
Sérum de poule.....	33 gr. 544	—	—

Les expériences ont été faites soit sur les sérums, soit sur des dilutions de ceux-ci à

$$\frac{1}{2}, \quad \frac{1}{5}, \quad \frac{1}{10}, \quad \frac{1}{50}, \quad \frac{1}{100}, \quad \frac{1}{1000},$$

Le tableau suivant indique les résultats obtenus avec le sang de bœuf.

TABLEAU VI
Sérum de Bœuf : 2 cent. cubes
Immu-Sérum obtenu par injections hypodermiques : XV gouttes

DURÉE de la RÉACTION	SÉRUM NON DILUÉ contenant 56 gr. 317 d'alb. par litre Opération sur : 112 millig. 6 d'alb.	SÉRUM DILUÉ au 1/2 contenant 28 gr. 1585 d'alb. par litre Opération sur : 56 millig. 3 d'alb.	SÉRUM DILUÉ au 1/5 ^e contenant 11 gr. 2637 d'alb. par litre Opération sur : 22 millig. 52 d'alb.	SÉRUM DILUÉ au 1/10 ^e contenant 5 gr. 6317 d'alb. par litre Opération sur : 11 millig. 26 d'alb.	SÉRUM DILUÉ au 1/50 ^e contenant 1 gr. 1263 d'alb. par litre Opération sur : 2 millig. 225 d'alb.	SÉRUM DILUÉ au 1/100 ^e contenant 0 gr. 563 d'alb. par litre Opération sur : 1 millig. 126 d'alb.
Avant 50 m.	Rien	Rien	Rien	Rien	Rien	Rien
Au bout de 50 m.	quelques rares flocons	Quelques très rares flocons	id.	id.	id.	id.
14 h.	quelques flocons mais volumineux	quelques rares flocons volumin.	rares flocons	rares flocons	id.	id.
24 h.	précipité floconneux	précipité	léger précipité	léger précipité	flocons	flocons

Le sérum et sa solution au 1/2 contenant encore 28 gr. 1585 d'albuminoïdes ont seuls donné un trouble en 50 minutes, et pourraient prêter à confusion. Mais déjà la solution à 1/5 contenant 11 gr. 2632 d'albuminoïdes par litre,* et fournissant encore 22 milligr. 52 d'albumine sous un volume de 2 cc. ne se trouble plus qu'au bout de 14 heures. Quant aux dilutions au 1/50^e et au 1/100^e, qui dans 2 cc. contiennent une quantité d'albuminoïdes égale à celle qui est suffisante pour obtenir une réaction nette en une heure ou deux avec le sang humain, elles n'ont donné que quelques rares flocons en 24 heures.

Toutes les dilutions de sérum de cheval n'ont donné un trouble qu'à la seizième heure. La solution au 1/50^e qui contenait 0 gr. 838 d'albuminoïdes par litre et 1 milligr. 67 pour 2 cc. n'a donné qu'un *très léger* précipité au bout du même temps, et absolument aucun trouble en cinq heures.

Les dilutions de sang de mouton à 1/2 et à 1/10 n'ont donné un trouble qu'en seize heures.

La solution à 1/50^e contenant encore 0 gr. 9123 d'albuminoïdes par litre, soit 1 milligr. 82 pour 2 cc., n'a rigoureusement rien donné en 16 heures, comme, du reste, les solutions plus étendues.

Les dilutions de sang de poule n'ont donné absolument aucun trouble en 16 heures.

Ainsi, alors qu'il suffit d'une à deux heures, au maximum, pour obtenir un trouble très net et même un précipité avec des solutions contenant 1 milligr. d'albuminoïdes de sang humain dans 2 cc. de liquide, soit 0 gr. 50 par litre, les dilutions des autres sérums, même beaucoup plus concentrés (10 fois plus), ne donnent rien dans ce laps de temps. Les résultats obtenus avec le sang de poule sont même remarquablement probants.

ACTION DES IMMUNI-SERUMS SUR DES DILUTIONS
A RICHESSE ÉGALE D'ALBUMINOÏDES
DE DIFFÉRENTES ESPÈCES DE SANG

En présence des résultats généraux précédents, j'ai songé à effectuer la séro-réaction sur des dilutions sanguines de même richesse en albuminoïdes.

J'ai opéré :

A. — Avec l'immuni-sérum obtenu par injections intra-péritonéales.

B. — Avec l'immuni-sérum obtenu par injections hypodermiques.

Sur des dilutions à 1 gr. 50 d'albumine :

- 1° De sang humain frais (taches de pansement);
- 2° De sang humain ancien (taches du mois de mars 1908);
- 3° De sang de mouton;
- 4° De sang de cheval.

Les deux tableaux suivants indiquent les résultats obtenus.

TABLEAU VII

Dilutions de Sang et de Sérums de diverses espèces animales
ramenées à un même titre (1 gr. 5 d'Albumine par litre) : 2 cent. cubes
Immunis-sérum obtenu par injections intrapéritonéales : XV gouttes

DURÉE de la RÉACTION	SANG FRAIS HUMAIN	SANG VIEUX HUMAIN	SÉRUM DE CHEVAL	SÉRUM DE MOUTON
au bout de 10 m.	Trouble net	Trouble	Néant	Néant
30 —	Trouble et petits flocons	id.	id.	id.
1 h.	Précipité en suspension	Trouble et petits flocons	id.	id.
1 h. 30 —	Flocons et précipité	Flocons	id.	id.
2 h.	Précipité abondant et flocons	Précipité assez abondant et flocons	id.	Très légers flocons à la paroi sans trouble
2 h. 30 —	id.	id.	id.	id.
3 h.	id.	id.	id.	id.
3 h. 30 —	Précipité abondant réuni	Précipité assez abondant réuni	id.	Très léger précipité au fond
4 h.	id.	id.	id.	id.
6 h. 30 —	Précipité très abondant	Précipité abondant réuni	id.	Léger précipité
Opération sur 3 milligrammes d'albumine				

TABLEAU VIII

Dilutions de Sang et de Sérums de diverses espèces animales ramenées au même titre

(1 gr. 5 d'albumine par litre) : 2 cent. cubes

Immuni-Sérum obtenu par injections hypodermiques : XV gouttes

DURÉE de la RÉACTION	SANG FRAIS HUMAIN	SANG VIFUX HUMAIN	SÉRUM DE CHEVAL	SÉRUM DE MOUTON
Au bout de 10 m.	Trouble net	Trouble	Néant	Néant
30 m.	id.	id.	id.	id.
1 h.	Trouble et petits flocons	id.	id.	id.
1 h. 30 m.	Flocons et précipité	Flocons	id.	id.
2 h.	Précipité abondant et flocons	Précipité et flocons	id.	Très légers flocons à la paroi sans troubles
2 h. 30 m.	id.	id.	id.	Très légers flocons à la paroi et au fond
3 h.	id.	id.	id.	Très léger précipité
3 h. 30 m.	Précipité abondant réuni	Précipité réuni	id.	id.
4 h.	id.	id.	id.	id.
5 h.	id.	id.	légers flocons	id.
6 h. 30 m.	Précipité très abondant	Précipité abondant	Léger précipité	Léger précipité

Opérations sur 3 milligrammes d'albumine.

Il ressort de ces expériences que :

1° Les deux sérums ont une activité sensiblement identique;

2° Les dilutions de sang humain se sont troublées en dix minutes;

3° Le précipité s'est formé en une ou deux heures, aussi bien avec la dilution de sang frais qu'avec celle du sang ancien.

4° Le sang de mouton à la dilution de 1 gr. 50 d'albuminoïdes par litre, a donné avec les deux immuni-sérums, de très légers flocons en 2 heures, et un léger précipité (en aucun cas comparable à celui que donne le sang humain à la même dilution), en 3 heures ou 3 h. 30 ;

5° La dilution de sang de cheval a donné de très rares flocons en 6 h. 30 seulement.

Nous avons recommencé ces mêmes opérations avec des solutions de sang humain, de sang de mouton, de cheval, de poule, à la dilution de 0 fr. 50 d'albumine par litre, en opérant toujours sur 2 cc. de liquide, soit sur un milligr. d'albuminoïdes.

Les deux tableaux suivants indiquent les résultats obtenus:

TABLEAU IX

Dilutions de Sang et de Sérums de diverses espèces animales ramenées au même titre
(0 gr. 5 d'albumine par litre) : 2 cent. cubes.

Immun-Sérum obtenu par injections intrapéritonéales : XV gouttes

DURÉE DE LA RÉACTION	SANG FRAIS HUMAIN	SANG VIEUX HUMAIN	SÉRUM DE MOUTON	SÉRUM DE CHEVAL	SÉRUM DE POULE
Au bout de 20 m.	Trouble	Trouble	Néant	Néant	Néant
40 m	Trouble net	Trouble net	id.	id.	id.
1 h.	id.	id.	id.	id.	id.
1 h 30 —	id.	id.	id.	id.	id.
2 h.	Trouble et flocons très petits	Trouble et flocons très petits	id.	id.	id.
4 h.	Flocons très ets	Flocons nets mais moins nombreux	id.	id.	id.
4 h. 30 m.	Précipité	Précipité	id.	id.	id.
6 h. 30 m.	Précipité et flocons	Précipité et flocons	id.	id.	id.
7 h. 30 m.	id.	id.	Trouble (?)	Trouble très léger	id.
8 h.	id.	id.	Trouble très léger	id.	id.
9 h.	id.	id.	id.	id.	id.

Opérations sur 1 milligramme d'albumine

TABEAU X
Dilutions de Sang et de Sérums de diverses espèces animales ramenées au même titre
(0 gr. 5 d'alumine par litre) : 2 cent. cubes
Immun-Sérum obtenu par injections hypodermiques : XV gouttes

DURÉE DE LA RÉACTION	SANG FRAIS HUMAIN	SANG VIEUX HUMAIN	SÉRUM DE MOUTON	SÉRUM DE CHEVAL	SÉRUM DE POULE
Au bout de 20 m.	Trouble	Trouble	Néant	Néant	Néant
— 40 —	id.	id.	id.	id.	id.
— 1 h.	id.	id.	id.	id.	id.
— 1 h.	id.	id.	id.	id.	id.
— 2 h.	id.	id.	id.	id.	id.
— 4 h.	Trouble avec de nombreux flocons très petits	Trouble et nombreux flocons très petits	id.	id.	id.
— 4 h. 30	Flocons en suspension	Flocons en suspension	Trouble (probabl. acid.)	id.	id.
— 6 h. 30 —	Précipité et flocons	Précipité et flocons	Flocons extr. petits	id.	id.
— 7 h. 30	id.	id.	id.	id.	id.
— 8 h.	id.	id.	id.	id.	id.
— 9 h.	id.	id.	id.	Trouble léger	id.
Opérations sur 1 milligramme d'alumine.					

Dans ce cas, encore, on peut tirer de ces expériences, les indications suivantes :

1° Les deux immuni-sérums paraissent d'activité sensiblement identique.

2° Les dilutions de sang frais et de sang ancien ont été troublées en vingt minutes; les flocons se produisirent en 4 heures; le précipité ne s'est réuni au fond des tubes, qu'en 4 ou 6 heures.

3° A ce moment, seul le sérum de mouton a offert un léger trouble qui, 9 heures après, avait fourni des flocons sans précipité.

4° Quant aux sérums de sangs de cheval et de poule, ils n'avaient rigoureusement rien donné en huit heures, ou, au plus, un trouble à peine perceptible.

On peut donc conclure de ces expériences, qu'avec les sérums obtenus, il a suffi de 1 milligr. d'albuminoïdes de sang humain pour obtenir des résultats nettement positifs, et que les dilutions de même richesse d'albumines d'autres animaux ne pouvaient prêter à confusion.

DE L'ACTIVITÉ DES IMMUNI-SÉRUMS

Je crois devoir rapporter ici les résultats d'une tentative peu heureuse faite tout d'abord.

Deux lapins furent immunisés, l'un par injections intrapéritonéales, l'autre par injections hypodermiques de liquide d'ascite.

Dans le tableau qui suit sont consignés :

- 1° Les dates des injections ;
- 2° Le poids de l'animal à chaque injection ;
- 3° Le nombre de centimètres cubes de liquide albumineux injectés.

TABLEAU XI

LAPIN N° 1			LAPIN N° 2		
DATES des INJECTIONS	POIDS de L'ANIMAL	NOMBRE de CENT. CUBES INJECTÉS	DATES des INJECTIONS	POIDS de L'ANIMAL	NOMBRE de CENT. CUBES INJECTÉS
21 avril 1909	1572 gr.	10	21 avril 1909	1847 gr.	10
26 —	1832 —	10	26 —	1907 —	10
4 mai 1909	1935 —	5	4 mai 1909	2037 —	10
10 —	1830 —	10	10 —	2015 —	10
18 —	1877 —	10	18 —	2000 —	10
24 —	1928 —	10	24 —	2087 —	7
27 —	2025 —	4	27 —	2150 —	4
1er juin 1909	1935 —	4	1er juin 1909	2125 —	4
		63			65

Les injections ont été commencées le 21 avril et cessées le 1^{er} juin. Les animaux furent sacrifiés le 4 juin, c'est-à-dire trois jours après la dernière injection.

Une solution de sang humain frais, dont on n'avait malheureusement pas déterminé la teneur en albumine a donné avec le sérum intra-péritonéal des flocons nets en une heure, et un précipité en deux heures.

Avec la solution du sang du mois de mars 1908, titrant 4 gr. 4145 d'albumine, il s'est formé un louche en 40 minutes, des flocons en 2 heures, et un précipité en 4 h. 30.

Cette même solution diluée au 1/2, c'est-à-dire contenant 2 gr. 207 d'albumine, n'a donné un précipité qu'en cinq heures.

Quant aux solutions plus étendues, elles n'ont donné qu'un léger louche en 4 heures, alors que le sang non additionné de sérum commençait aussi à se troubler.

J'ai fait, dans ce cas, varier les quantités de sérum actif de X à XX et XXX gouttes pour 2 cc. de la solution de sang humain.

Le sérum obtenu par injections hypodermiques m'a fourni des résultats à peu près analogues.

Il n'a été possible de caractériser avec ces immuni-sérums qu'une quantité d'albumine égale à 4 milligr. 4, soit 1/2 centigramme environ.

Ces sérums étaient donc beaucoup moins actifs que les précédents, soit que la quantité d'albumine humaine injectée ait été sensiblement inférieure, 63 et 65 cc. de liquide d'ascite, contre 88 et 79 cc. qui avaient été injectés aux lapins des premières expériences rapportées ici, soit, ce qui est plus probable, que le temps écoulé entre la dernière injection et la saignée (trois jours) ait été insuffisant, ainsi que l'ont fait remarquer Linossier et Lemoine.

CONCLUSIONS

1° Les immuni-sérums humains, que nous avons obtenus par un nombre à peu près identique d'injections hypodermiques ou intra-péritonéales pratiquées à des lapins, se sont montrés aussi actifs l'un que l'autre.

2° Les sérums obtenus en sacrifiant les animaux trois jours après la dernière injection se sont montrés moins actifs que ceux qui ont été obtenus en sacrifiant les animaux six jours après la dernière injection.

3° Ces derniers ont amené un louche en une heure, un trouble net en 1 h. 45 minutes, et de légers flocons en 3 h. 45 avec 2 centimètres cubes de dilution sanguine contenant un milligramme d'albuminoïdes du sang, soit avec 0 gramme 5 de protéines par litre.

4° Avec 1 milligr. à 1 milligr. 5 d'albuminoïdes, la réaction était nette en dix minutes, les flocons en une heure ou une heure et demie. En trois heures et demie ou quatre heures, ils étaient réunis en précipité au fond du tube.

5° Le sérum de bœuf non dilué et sa solution au 1/2 contenant 38 gr. 1585 d'albuminoïdes par litre ont donné un trouble en 50 minutes. Mais la dilution de ce sérum à 1/5° ne s'est plus troublée qu'en 14 heures.

Le sérum non dilué de cheval n'a donné un trouble qu'en 16 heures, tandis que la dilution à 1/5° ne donnait rien en 5 heures et un trouble très léger en 16 heures.

6° Dans les dilutions de sérum humain à 1 gr. 50 d'albuminoïdes par litre, soit 3 milligr, pour 2 cc., les immuni-sérums ont donné un trouble en dix minutes et un précipité en une heure; tandis que le sang de mouton à la même dilution ne donnait que de très légers flocons en 2 heures et un léger précipité en 3 heures ou 3 h. 30 : les dilutions de sang de cheval n'ont donné que de très rares flocons en 6 h. 30.

7° Avec des dilutions à 0 gr. 50 d'albuminoïdes de sang humain par litre, soit 1 milligramme pour 2 cc., ces sérums ont donné un trouble très apparent en 20 minutes, des flocons en 4 heures et un précipité en 6 heures.

A ce moment, seul le sérum de mouton à la même dilution, 0 gr. 50 d'albuminoïdes par litre, a offert un très léger trouble qui, 9 heures après, s'était réuni en flocons sans précipité.

Les sérums de sang de cheval et de poule n'ont rigoureusement rien donné en 8 heures ou au plus un trouble à peine perceptible.

8° Il ne semble pas que l'état de décomposition plus ou moins avancée du sang ait une influence fâcheuse sur la réaction.

Vu bon à imprimer :
Montpellier, le 21 février 1910.
Le Président de la thèse,
H. IMBERT.

Vu et approuvé :
Montpellier, le 21 février 1910.
Le Directeur de l'Ecole,
G. MASSOL.

Vu et permis d'imprimer :
Montpellier, le 22 février 1910.
Pour le Recteur :
Le Vice-Président du Conseil de l'Université,
LÉON PÉLISSIER.

